

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 40 751 A 1**

⑥1 Int. Cl. 7:
G 01 N 21/62

②1 Aktenzeichen: 199 40 751.7
②2 Anmeldetag: 27. 8. 1999
④3 Offenlegungstag: 2. 3. 2000

DE 199 40 751 A 1

⑥6 Innere Priorität:

198 39 255. 9	28. 08. 1998
198 39 256. 7	28. 08. 1998
198 39 254. 0	28. 08. 1998
199 24 327. 1	27. 05. 1999
199 07 080. 6	19. 02. 1999

⑦1 Anmelder:

FeBiT Ferrarius Biotechnology GmbH, 69469
Weinheim, DE

⑦4 Vertreter:

H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

⑦2 Erfinder:

Stähler, Fritz, Dr., 69469 Weinheim, DE; Stähler, F.,
69469 Weinheim, DE; Stähler, F., 68169 Mannheim,
DE; Lindner, Hans, 70569 Stuttgart, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Lichtemissions-Detektionseinrichtung

⑤7 Es wird eine Lichtemissions-Detektionseinrichtung vorgeschlagen, die eine LCD-Matrix als zweidimensionale steuerbare Lichtquelle und eine der LCD-Matrix zugewandt-gegenüberliegende CCD-Matrix zur Detektion des optischen Verhaltens einer jeweiligen zwischen LCD-Matrix und CCD-Matrix befindlichen Probensubstanz aufweist. Gegenstand der Erfindung ist ferner eine LCD-Matrix als zweidimensionale Lichtquelle zur gesteuert wahlweisen Erzeugung von zweidimensionalen Belichtungsmustern bei der Durchführung von Herstellungs- oder/und Untersuchungsverfahren mit wenigstens einem zweidimensionalen Belichtungsschritt.

DE 199 40 751 A 1

Beschreibung

1. Anwendungsgebiet der Erfindung

1.1 Hintergrund

Durch eine Miniaturisierung bei gleichzeitiger Funktionsintegration von Bauteilen, Komponenten und ganzen Systemen werden in vielen Technologiefeldern und Branchen immer neue Anwendungen erschlossen. Die Anwendungen reichen von der Sensorik, wie zum Beispiel bei ABS im PKW Bereich, bis zur Aktorik, zum Beispiel in Form von Mikropumpen. Die Branchen reichen vom klassischen Maschinenbau über Automobil- und Luftfahrtindustrie bis zur Medizintechnik oder der zukunftsweisenden Biotechnologie. In der Medizintechnik werden beispielsweise neue Implantate entwickelt und im Bereich der Pharmaindustrie werden neue Technologien für die effiziente Entwicklung neuer Medikamente mit enormen Aufwand vorangetrieben, wovon die Biotechnologie stark profitiert, da man sich hier das größte Entwicklungspotential erhofft.

Für eine wirtschaftliche Produktion im Mikrobereich werden neue Verfahren entwickelt, die den veränderten Randbedingungen gerecht werden. Das gleiche gilt für die benötigten Inspektionstechniken für die Überwachung der miniaturisierten Vorgänge. Am weitesten fortgeschritten ist diese Entwicklung im Bereich der Halbleiterproduktion. Hier werden, basierend auf der Verwendung von photochemischen Verfahren, durch Photolithographiesysteme feinste Strukturen in Silizium-Plättchen geätzt. Es entstehen so extrem dicht gepackte, elektrische Schaltkreise, welche die Basis moderner Rechner wie des Personal Computers (PC) bilden. Zunehmend werden diese Techniken aber auch für die Herstellung von miniaturisierten Strömungsgeometrien (Mikrofluidsystemen), wahlweise mit integrierten Elektroden und Sensoren, verwendet. Die neueste Anwendung der Photolithographie liegt im Bereich der Biotechnologie in der örtlich hochauflösenden, lichtaktivierten Oligo-Synthese bei der Produktion von DNA-BioChips durch die Firma Affymetrix.

1.2 Bedarf

In einer Vielzahl dieser Anwendungen und Entwicklungen besteht ein großer Bedarf an der Entwicklung neuer, universell einsetzbarer, kompakter und billiger Produktions-, Analyse und Inspektionssystemen auf Lichtbasis. Dies umfaßt die Weiterentwicklung der Photolithographie ebenso wie die Etablierung neuer Systeme als Basis für neue optische Verfahren.

So werden derzeit sehr aufwendige, große und damit teure photolithografische Verfahren für eine Vielzahl an Anwendungen im Bereich der photoaktivierbaren Chemie zum Beispiel zum präzisen Ätzen von Halbleiterchips verwendet. Des weiteren wird bei optischen Detektionssystemen an immer weiter gehenden Verbesserungen der Sensoren gearbeitet. Ein kompaktes, miniaturisiertes Komplettsystem wie in diesem patent beschrieben ist noch nicht verfügbar.

1.3 Anwendungsfelder

Für eine hochauflösende, individuell ansteuerbare Lichtmatrix gibt es unzählige Anwendungen, von denen nur einige exemplarisch aufgeführt werden können. Das gleiche gilt für eine Kombination mit einem hochauflösenden Detektor, wie es in der LCCD-Unit nach der vorliegenden Erfindung ebenfalls vorgesehen ist. Mögliche Anwendungen gibt es auch hier zum Beispiel im Bereich von Mikroelektro-

nik zur Prozessüberwachung in der Fertigung, in der Chemietechnik oder in unzähligen Anwendungen als hochparallele Lichtschranke zum Beispiel in Inspektionseinheiten.

Mikrosystemtechnik

Einsatz in der Mikrosystemtechnik als Inspektionseinheit (z. B. Lokalisieren von kleinsten Bauteilen oder Überwachung von Strömungsvorgängen in Mikrostrukturen).

Silizium-Chip-Produktion

Photolithographisch aktivierte Ätzverfahren für die Silizium-Chip Herstellung.

Oligo-Synthese (Biotechnologie)

Wichtiges Schlüsselkriterium zur Herstellung von dichten und hochdichten BioChip-Anordnungen bzw. Arrays ist die gezielte, lokalisierte Platzierung der jeweiligen biochemischen Komponenten (z. B. DNA-Oligos) auf der 2D-Matrix der Chip-Oberfläche. Dies erfolgt derzeit für hochdichte Arrays durch aufwendige photolithographische Synthesen.

Neue Nachweisverfahren in der Diagnostik

In der Diagnostik konnten durch die Miniaturisierung technischer Komponenten und durch die Beschleunigung und Parallelisierung von Prozessen wie Synthesen oder Analytendetektion wesentliche Fortschritte erzielt werden. Mittels neuer Belichtungs- und Detektionssysteme ließen sich neu Nachweisverfahren für chemische bzw. biochemische Reaktionen (z. B. DNA-Hybridisierung) entwickeln.

2. Stand der Technik

Alle optischen Systeme bestehen zunächst einmal aus den folgenden Komponenten:

- Mindestens einer Lichtquelle (kann auch natürliches Licht aus der Umgebung sein).
- Meistens einer Optik bestehend aus Filtern, Linsen und Gittern (hierunter fallen auch Glasfaserlichtleiter).
- Einem Detektor (optischer Sensor, kann in einfachen Mikroskopen auch direkt das menschliche Auge sein).
- Einer Anzeige der Meßsignale (heutzutage meist ein PC mit der entsprechenden Bildanalyse-Software).

In dieses optische System wird der zu untersuchende oder zu bearbeitende Gegenstand eingebracht.

2.1 Optische Untersuchungsverfahren

Dient das optische System einer Untersuchung des Gegenstandes bzw. des Untersuchungsgutes, so wird keine gezielte Veränderung an dem Gegenstand vorgenommen, zumindest nicht absichtlich. Die optischen Untersuchungsverfahren lassen sich in passive und aktive Verfahren einteilen.

Bei passiven Verfahren wird das Untersuchungsobjekt von aussen beleuchtet und alle Veränderungen des Lichtes (Spektralen, Winkel etc.) gemessen. Man spricht hierbei von Absorptionsmessung bei Gasen, Flüssigkeiten und teiltransparenten Festkörpern und Oberflächenerkennung bei Festkörpern. Je nach Strahlengang des Lichtes spricht man von Durchlicht, Rücklicht oder beispielsweise Streulicht, welches erfaßt, also detektiert wird. Sowohl bei den Lichtquellen, als auch bei der Optik zwischen Lichtquelle und Untersuchungsgegenstand sowie der Optik zwischen Gegenstand

und den unterschiedlichen Detektoren gibt es je nach Anwendung eine Vielzahl von Ausführungen.

Lichtquellen:

- Lampen (z. B. Deuterium oder Halogen) mit unterschiedlichen Spektren und Intensitäten.
- Blitzlampen für kurze energiereiche Strahlung.
- Monochromatisches Laserlicht etc.

Optiken und optische Komponenten:

- Unterschiedliche Linsen zur Lichtbündelung oder Aufweitung (z. B. auf einen Punkt fokussieren oder einen Laserstrahl zu einem Lichtstrich aufweiten) und optische Körper wie zum Beispiel Prismen.
- Unterschiedliche Filter (z. B. Farbfilter zur Reduktion der Energie des Lichtes und damit einer Verlängerung der Lichtwellen Spektrens), optische Gitter (z. B. zur Spektralfarbenzerlegung eines Lichtstrahls in einem Spektralphotometer) und Blenden zur Lichtmengenreduktion.
- Glasfaserlichtleiter (dienen in der Regel der Lichtführung als Alternative zu aufwendigen Spiegelsystemen, wenn Licht zu oder von schwer zugänglichen Orten strahlen soll; als oft gewollter Nebeneffekt wird das Licht parallelisiert).

Detektoren:

- Photomultiplier-PMT (Kann nur ein Signal erfassen, verstärkt es dafür direkt).
- Photodioden (auch als Array mit kleiner bis mittlerer Anzahl an optischen Sensoren verfügbar).
- Charged Coupled Device-CCD (als ein- und zweidimensionale Arrays mit extrem großer Pixelanzahl pro Chip verfügbar – Stand der Technik: 18 Mio. Pixel auf einem Chip, Stand der Forschung: 81 Mio. Pixel auf einem Chip).

Bei aktiven optischen Detektionsverfahren sendet der Untersuchungsgegenstand Licht aus, welches wiederum gemessen wird. Hierzu werden auf der Detektionsseite ähnliche oder sogar die gleichen Komponenten verwendet wie bei den passiven Verfahren. Die Lichtemission kann permanenter Natur sein, häufig wird sie jedoch erst im optischen Untersuchungssystem ausgelöst. Typische Verfahren sind die Lumineszenz (wird chemisch oder biologisch durch die Zugabe entsprechender Stoffe ausgelöst, die Elektrochemilumineszenz (wird durch ein elektrischen Energieeintrag via Elektroden ausgelöst) oder die Fluoreszenz (wird durch energiereiches Anregungslicht ausgelöst).

Typische Beispiele für Optische Untersuchungssysteme sind:

- Mikroskope (oft mit CCD-Kamera und Bildanalysesoftware).
- Spektrometer (Absorption, Lumineszenz- oder Fluoreszenz).
- Lichtstrichverfahren für die Erfassung dreidimensionaler Geometrien.
- Stereobilderfassung mit zwei Kameras.

Alle bekannten Verfahren zeichnen sich durch eine mehr oder weniger einfache Anordnung auf der Seite der Lichtquelle aus. Auf der Detektorseite wurden dagegen, basierend auf der schnellen Weiterentwicklung der Halbleitertechnik, hoch parallele Sensoren entwickelt, welche über entsprechende Videokarten und Analysesoftware direkt an

die immer leistungsfähiger werdenden Computer angekoppelt werden können.

2.2 Optische Produktionsverfahren

Beispiele für optische Produktionsverfahren sind die Lasertechnik als direktes Bearbeitungsverfahren und die Photolithographie welche, in Kombination mit photochemischen Reaktionen, lokal hochauflösend chemische Reaktionen anregen kann. Durch das photolithographisch angeregte Ätzen wurde die Produktion hochdichter, miniaturisierter Strukturen ermöglicht. Die notwendigen Anlagen sind jedoch sehr aufwendig und nur sehr aufwendig durch einen Maskenwechsel auf ein anderes Belichtungsmuster umrüstbar. Bei der Anwendung zur DNA-Chip-Synthese dagegen wird eine Vielzahl an Syntheseyklen bei einer vergleichsweise niedrigen Parallelität benötigt.

3. Gegenstand der Erfindung und damit gelöste Aufgabe

Gegenstand der Erfindung ist eine Lichtemissions-Detektionseinrichtung mit einer elektronisch steuerbaren Lichtquellenmatrix, vorzugsweise LCD-Matrix, und einer der Lichtquellenmatrix zugewandt-gegenüberliegenden Lichtsensormatrix, vorzugsweise CCD-Bildaufnehmer, zur Detektion des optischen Verhaltens einer jeweiligen zwischen Lichtquellenmatrix und Lichtsensormatrix befindlichen Substanz, insbesondere Probensubstanz.

Gegenstand der Erfindung ist ferner eine LCD-Matrix als zweidimensionale Lichtquelle zur gesteuert wahlweisen Erzeugung von zweidimensionalen Belichtungsmustern in Herstellungs- und Untersuchungsverfahren mit wenigstens einem Belichtungsschritt, beispielsweise in photolithographischen Verfahren oder in der zweidimensionalen Spektroskopie.

Die Erfindung beruht auf der Nutzung von LCD Geräten als hochparallele, hochauflösende und ortsspezifische Anregungslichtquelle. Diese neue Lichtmatrix eröffnet durch ihre Flexibilität eine Vielzahl an Anwendungsmöglichkeiten. LCD-Geräte sind durch den breiten Einsatz im elektronischen Konsumgüterbereich extrem weit entwickelt und dadurch zuverlässig, billig und extrem klein. Eine mögliche Anwendung dieser Anregungsmatrix ist der Ersatz der aufwendigeren Photolithographie (z. B. bei der photoaktivierten Oligosynthese bei der Herstellung von DNA-BioChips), bei weniger hohen Auflösungen, wie beispielsweise bei einfachen Si-Chips oder den DNA-BioChips.

Besonders interessant ist die Kombination mit einem CCD-Bildaufnehmer (CCD-Kamera-Chip). Ordnet man diese beiden Chips einander gegenüber an, so erhält man eine extrem kompakte, hochparallele Anregungs-, Inspektions- und Detektionseinheit für eine noch größere Vielzahl von Anwendungen. Es wird eine völlig neuartige zweidimensionale Lichtemissions-Detektionseinheit geschaffen, welche ihr enormes Potential durch das intelligente Zusammenspiel von LCD Ansteuerung und CCD Auslesung voll entwickelt. Hier bietet die Leistungsfähigkeit moderner Rechner und Softwaresysteme enormes Anwendungs- und Entwicklungspotential, wobei man sowohl bei der Hard- als auch der Software auf die vorhandenen Systeme zur Nutzung der LCD als Mensch-Maschinen-Schnittstelle aufbauen kann.

Bei Anwendungen als Kombination aus Lichtquelle und Detektor ist die Intensitätsempfindlichkeit (264 Stufen) und die Unterscheidung von Farben (d. h. Wellenlängen) im CCD Chip (z. B. Filtern von Peaks für Rot, Grün und Blau oder andere Farben je nach Filtern vor den Pixeln) für ein zweidimensionale Spektroskopie geeignet. Damit wird Syn-

these, Prozesskontrolle, Anregungslicht (z. B. Anwendung für "Fraktal Capillary Chip-FCC", Kapitel 6) und ggf. auch die Partikellokalisierung (z. B. Anwendung für "Fraktal Smart Chip-FSC", Kapitel 6) sowie eine Signaldetektion (auch neue Verfahren) in einer einzigen kompakten Sandwich-Anordnung geleistet.

Bevorzugt wird die erfindungsgemäße Lichtemissions-Detektionseinrichtung in einem Verfahren zur Herstellung eines Reaktionsträgers für die Bestimmung von Analyten, insbesondere Nukleinsäureanalyten, in einer Probe, insbesondere in einer biologischen Probe verwendet. Dabei können durch orts- oder/und zeitspezifische Belichtungsvorgänge funktionelle biologische oder biochemische Materialien oder Bausteine solcher Materialien gegebenenfalls in mehreren Schritten auf dem Reaktionsträger synthetisiert werden.

Weiterhin bevorzugt ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Lichtemissions-Detektions-Einrichtung zur Bestimmung von Analyten in einer Probe, insbesondere in einem optischen Nachweisverfahren, wobei auf einem zwischen Lichtquellenmatrix und Lichtsensormatrix angeordneten Reaktionsträger durch Bindung des Analyten an den Reaktionsträger ein optisch, durch die Lichtsensormatrix nachweisbares Signal erzeugt wird.

4. Grundzüge des Lösungsweges

Die neuartige Einheit besteht aus einem LC-Display, welches genau gegenüber einem CCD-Sensor platziert wird, so daß er als Lichtquelle dient.

Zwischen die beiden Matrizen wird ein zu untersuchender/zu analysierender/-anzuregender oder anderweitig gezielt mit Licht zu bestrahlender und synchron nach Lichterscheinungen zu untersuchender Gegenstand oder sonstiges Untersuchungsgut eingebracht. Es entsteht eine Art Sandwichaufbau aus LCD Lichtquelle, Untersuchungsgegenstand und CCD-Detektionseinheit. Zwischen der LCD Lichtquelle und dem Untersuchungsgegenstand, ebenso wie zwischen dem Untersuchungsgegenstand und dem CCD-Detektions-Chip soll vorzugsweise nur ein minimaler Abstand bestehen, um die Abweichung (Streuung) des Lichtes vom LCD-Pixel zum gegenüberliegenden CCD-Pixel zu minimieren.

4.1 Anregungsmatrix

Liquid Crystal Displays als Anzeigeeinheit werden mit niedriger Auflösung schon sehr lange Zeit hergestellt und verwendet. Diese Anwendungen reichen von Anzeigen in elektronischen Radioweckern über jede Art von Gerätedisplay bis zu Armbanduhren oder beispielsweise Thermometern. Gerade die Anwendung in stückzahlintensiven Bereichen der Konsum- und Massengüterindustrie – wie zum Beispiel Laptops – hat, analog zur Halbleitertechnik, zu einem rasanten Entwicklungsfortschritt gerade in den letzten Jahren beigetragen. Mittlerweile sind erste LCD-Flachbildschirme als Alternative zu herkömmlichen Computermonitoren mit 21" Bild diagonale und SVGA-Standard erhältlich. Ebenso schreitet die Miniaturisierung voran. Der kleinste LCD Bildschirm ist bei SVGA Standard nur noch ca. 1 cm² groß. Allerdings werden hier die Bildpunkte nur schwarz-weiß erzeugt und abwechselnd mit den RGB Farben überlagert. Dies geschieht so schnell, das für das menschliche Auge ein Farbbild entsteht. Somit ist die LCD-Technik endgültig in den Bereich hochauflösender Anzeigen vorgedrungen.

Alle diese LCD-Chips besitzen eine Hintergrundbeleuchtung, welche ihre Lichtstrahlung durch ein lokal ansteuerba-

res Kristallgitter (Pixel) und nachfolgende Farbfilter (individuell für jeden Pixel) ausstrahlen. Durch die Lichtquelle wird die niedrigste und damit energiereichste Wellenlänge festgelegt. Die Filter vor den Pixeln erzeugen längerwelliges Licht und die Öffnung der Kristalle in einem Pixel bestimmt die Lichtintensität.

Lichtquelle:

Als Hintergrundlichtquelle kann eine Vielzahl an Lichtquellen eingesetzt werden. Z. B. Weißlicht für Detektionsaufgaben, UV (365 nm) für die Oligo-Synthese (Angabe Afymetrix), Blitzlicht für Fluoreszenzanregung oder Monochromatisches Licht für andere Nachweisverfahren.

4.2 Detektionsmatrix

Das gleiche wie für die LCD's gilt für die rasante Weiterentwicklung der Möglichkeit der optischen Erfassung von Lichtsignalen mit einem Charged Coupled Device-Chip. Diese CCD-Chips messen in jedem Pixel 256 Intensitätsstufen. Bei Farbmessungen werden je Farbe (RGB) 256 Intensitätswerte erfaßt, wodurch die mehr als 16 Mio. Farben der digitalen Bildverarbeitung entstehen. Diese Chips haben aktuell bis zu 2000 × 3000 Farbpixel (RGB-Dreifachpixel) auf einer Fläche von nur 25 × 37 mm. Auch hier wird durch die breite kommerzielle Anwendung der Chips, zum Beispiel in Digitalen Videokameras und Photoapparaten, die Entwicklung der Technologie sehr stark forciert. So haben erste Prototypen bereits auf der gleichen Fläche 81 Mio. Pixel. Damit ergibt sich auch für die nachfolgend beschriebene Applikation der CCD-Chip Technologie ein großes Wachstumspotential.

5. Entwickelte Verbesserungen und damit geschaffene Vorteile gegenüber vorhandenen Systemen

5.1 Hochparallele, hochauflösende Lichtmatrix

Die Anwendung von LCD-Chips als Lichtquelle bzw. Lichtmatrix eröffnete einen derzeit nicht verfügbare Flexibilität auf der Anregungsseite für eine Vielzahl an optischen Verfahren, welche auf der Detektionsseite durch die Anwendung von CCD-Chips schon wesentlich weiter vorangeschritten ist. Vorteil der LC-Lichtmatrix sind:

- Ein breites Wellenlängen Spektrum durch Hintergrundbeleuchtung und unterschiedliche, vorgeschaltete Farbfilter.
- Individuelle Wellenlängen und Intensitäten für jeden Lichtpunkt in einer hochdichten Matrix.

5.2 Neues Photolithographieverfahren

Durch die Verwendung von LC-Matrizes anstelle von festen Masken können Halbleiterchips mit mittlerer bis niedriger Dichte der Transistoren in wesentlich kompakteren und damit auch billigeren Geräten hergestellt (belichtet und geätzt) werden. Dies gilt insbesondere auch für den Einsatz der LC-Lichtmatrix als Syntheseinheit für DNA-BioChips.

Für den Einsatz in biochemischen Prozessen wie z. B. der belichtungsabhängigen Synthese von DNA-Oligos auf einer Trägermatrix stehen mit der Hintergrundlichtquelle verschiedene Lichtintensitäten (Wellenlänge) zur Verfügung. Für die Fertigung von DNA-Arrays hoher Dichte mittels lichtgesteuerter Synthese (Photolithographie) ist die computergestützte rasche und punktuelle Belichtung von Synthesestellen auf der Trägermatrix durch den LC-Display ein schnellerer, günstigerer und besser automatisierbarer Vor-

gang als die Verwendung von Masken.

Dasselbe sollte für Anwendungen in der Mikroelektronik gelten. Für DNA-BioChips kann dies den Durchbruch zu breiter Anwendung, z. B. in Routineuntersuchungen in der Diagnostik, bewirken.

Während der Syntheseschritte dient die LCCD-Einheit (LCD und CCD integriert) auch als Detektor z. B. für Flüssigkeitsbewegungen und erlaubt eine integrierte Qualitätskontrolle. Dies wirkt sich positiv auf Qualität und Ressourcenverbrauch aus und reduziert die Ausschussrate. Wenn keine Prozessüberwachung bei der Synthese benötigt wird und die Detektion in einem getrennten System erfolgt, kann an Stelle des CCD-Chips zum Beispiel auch eine Temperierungseinheit angeordnet werden.

5.3 Massive parallele Inspektionseinheit

Durch die Anordnung einer hoch parallelen Licht-Quellen-Matrix und einer hoch parallelen Licht-Detektions-Matrix entsteht eine breit einsetzbare, neuartige Inspektionseinheit, welche man auch als massive parallele Lichtschränke bezeichnen kann, die, wenn notwendig, auch noch die Vorteile einer quantitativen und qualitativen Anregung und Messung einschließt. Eine weitere Besonderheit ist die Möglichkeit, unterschiedlich farbiges (unterschiedliche Wellenlänge) Licht zu verwenden. Außerdem läßt sich die Anregungswellenlänge grundlegend durch die jeweilige Verwendung der geeigneten Hintergrundbeleuchtung der LCD Einheit bestimmen.

5.4 Neue optische Nachweisverfahren

Ein weitere Stärke dieser neuen Anordnung in einer LCCD-Unit sind die fast unendlichen Möglichkeiten, welche sich aus der Kombination von gezielter Anregung und gezielter Detektion in Verbindung mit modernen Hochleistungsrechner für die Ansteuerung und die Signalauswertung ergeben. Damit wird gerade für optische Nachweis- und Detektionsverfahren eine neue Technologieplattform geschaffen. Durch das "Durchtunen" der einzelnen Lichtpunkte im Zusammenspiel mit der CCD-Detektion und geeigneten Algorithmen zur Signalauswertung müßten kleinste Veränderungen in den einzelnen Messpunkten im LCD-CCD Lichtgitter möglich sein. Im Bereich der DNA-Analytik wäre beispielsweise die direkte Detektion einer Hybridisierung auf einem Messplatz denkbar.

5.5 Etablierte Softwaretools

Für die bisherige Anwendung als Mensch-Maschine-Schnittstelle ist eine Vielzahl an Hard- und Softwaretools vorhanden, auf die man bei der neuartigen Anwendung der LCD- und CCD-Technik zurückgreifen kann. Beispiele sind Grafikkarten, Videoschnittkarten und die dazugehörige Software.

5.6 Miniaturisierung und Funktionsintegration

Im Vergleich zu konventionellen photolithographischen Systemen bietet die neue LCCD-Unit die Möglichkeit einer extremen Miniaturisierung bei gleichzeitiger Funktionsintegration bei gleichzeitiger Verwendung als Synthese- und Analysesystem (ISA-System).

6. Ausführungsbeispiele

Ein Beispiel für einen solchen "Untersuchungsgegenstand" ist zum einen der Fraktal Smart Chip-FSC (wie er in

der am Anmeldetag der vorliegenden Anmeldung von den Anmeldern eingereichten deutschen Patentanmeldung 198 39 255.9 mit dem Titel "Verfahren und Meßeinrichtung zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in einer Probe" (beschrieben ist) oder der Fraktal Capillary Chip-FCC (wie er in der am Anmeldetag der vorliegenden Anmeldung von den Anmeldern eingereichten deutschen Patentanmeldung 198 39 256.7 mit dem Titel "Träger für Analytbestimmungsverfahren und Verfahren zur Herstellung des Trägers" beschrieben ist) als Anwendungsbeispiel für die Fraktale Bio-Chip Technologie. (Der Offenbarungsgehalt der beiden letztgenannten Anmeldungen wird in vorliegende Anmeldung einbezogen.) Für die Verwendung des FCC ist diese Einheit als Anregungseinheit von besonderer Bedeutung, da sie eine flexiblere, viel kompaktere und deutlich billigere Alternative zur Photolithographie (Affymetrix) darstellt. Natürlich wäre eine Aktivierung des FCC durch Photolithographie auch denkbar. Für den FCC ist eine örtlich auflösende Lichtquelle nicht zwingend notwendig, aber es ist wahrscheinlich, daß gerade durch die lokale Anregung eine wesentlich feinere und exaktere Detektion der unterschiedlichen Smart-Beads anhand ihrer jeweiligen Farbe möglich wird (mehr und diskretere Farbniveaus können verwendet werden). Des weiteren ist aber auch eine Vielzahl von Anwendungen in anderen Bereichen denkbar, z. B. für optische Untersuchungen. Gerade im Bereich der optischen Untersuchung von Mikrosystemen, um nur ein Beispiel zu nennen.

6.1 Anwendung des LCCD für den FCC

Besonders interessant wird der neue FC-Chip in Verbindung mit der neuen LCCD-Unit. Hier erfolgt die Photoaktivierung der Oligos bei der Herstellung des Chips direkt durch den LCD-Chip. Die hierfür benötigte Wellenlänge von 365 nm (oberer UV-Bereich nahe dem sichtbaren Licht) läßt sich, sofern noch nicht verfügbar, leicht zum Beispiel durch einen Wechsel der Hintergrundlichtquelle im LCD-Chip erreichen.

Durch die Kombination dieser beiden Erfindungen ist insgesamt eine viel kleinerer, flexiblere Anordnung mit einem stark reduzierten Fluidaufkommen realisierbar. Es ist sogar denkbar, daß der Anwender sich seine Chips selber erzeugt und direkt verwendet. Er lädt sich einfach die benötigten Daten (DNA-Sequenzen) von einer CD-Rom oder aus dem Internet und erzeugt in seiner LC-CCD-Unit (Aufbau analog einem externen Disketten- oder CD-Rom-Laufwerk) seinen individuellen DNA-Chip, benetzt ihn anschließend mit der Probe und liest die Signale aus.

Nutzt man zum Beispiel jeden zweiten Pixel in dieser Anordnung für die Photoaktivierung, so kann man die Pixel dazwischen, welche innerhalb einer Kapillare liegen, für eine permanente Prozeßkontrolle verwenden. So kann man zum Beispiel das Einströmen einer Luftblase zwischen zwei Fluiden in einer Kapillare individuell und dynamisch verfolgen. Auch ein Färben der Trägerfluide für G, A, C und T wäre denkbar, so daß die Anwesenheit der richtigen Oligos überprüfbar würde und eine Farbveränderung könnte eine Verschleppung signalisieren. Bei der anschließenden Detektion könnte wiederum eine ortsspezifische und wenn notwendig sogar farbspezifische Lichtanregung erfolgen. Hierdurch ergeben sich ganz neue Möglichkeiten für Nachweisverfahren, wie sie derzeit noch nicht vorhanden sind.

6.1.1 Überwachung der Strömungsvorgänge

Durch die LCCD-Unit können die Strömungsvorgänge in den Kapillaren in einem Glas- oder Kunststoffchip sowohl während der Produktion, sprich der Oligo-Synthese, als

auch während der Analyse überwacht werden. Hierzu können zum Beispiel Reinigungsluftblasen zwischen zwei Fluiden in den Kapillaren oder eine Färbung der einzelnen Fluide verwendet werden.

6.1.2 Lichtabhängige Oligo-Synthese

Für die lichtinduzierte Abspaltung von Schutzgruppen während der Synthese von DNA-Oligos auf dem Chip kann eine LCD-Hintergrundlichtquelle dienen, die die notwendige Wellenlänge von 365 nm erzeugt. Die benötigten Leistungen sind gering (14 mW pro cm² bei 2 cm Lichtauflänge in einer Quarzglasküvette, Angaben Affymetrix). Eventuell sind auch Weiterentwicklungen der Syntheschemie möglich, die z. B. unterschiedliche Wellenlängen ausnutzen.

6.1.3 Nachweisreaktion

Die Detektion der Nachweisreaktion im FC-Chip kann ebenfalls in der LCCD-Unit erfolgen. Wenn der Nachweis über Fluoreszenzmarker realisiert wird, müßte hierzu ggf. die Hintergrundbeleuchtung gewechselt werden (automatisch möglich). Ggf. kommen hier auch neue Detektionsverfahren zum Einsatz, welche erst durch die extrem flexible, individuelle Anstrahlung und Detektion des einzelnen Meßpunktes möglich werden.

6.1.4 Temperaturregulation während der Hybridisierung

Für eine Standard-Hybridisierung von DNA, RNA und PNA Strängen miteinander benötigt man eine Temperatur von ca. 55–65°C. Im einfachsten Fall kann diese Temperatur durch die abgestrahlte Energie der LCD Einheit erzeugt werden (Abwärme und Wellenlänge). Damit ließe sich eine weitere Kompaktierung der Anordnung erreichen.

6.2 Anwendung des LCCD für den FSC

Der fraktale Biochip zeichnet sich als Schlüsselcharakteristikum durch seine Zusammensetzung aus den einzelnen "fraktalen" Beads aus, die erst in ihrer Gesamtheit eine Vielfalt an Messpunkten repräsentieren (hochdichte Anordnung als "Array").

Für diesen Aufbau des Biochips aus Einzelelementen ist die Lokalisation und Zuordnung der einzelnen Beads durch einen geeigneten Detektor notwendig. Der Detektor soll entsprechend der vorgesehenen Lösung (FSC) aus einem CCD Chip bestehen. Ein solcher CCD Chip ist auch Bestandteil der LCCD-Unit. Darüberhinaus ermöglicht die LCCD-Unit eine ebenso lokalisierte Beleuchtung. In der Kombination erscheint die Unit daher besonders geeignet, um die Bestandteile des fraktalen Chips zu lokalisieren, zu identifizieren und mit entsprechender Software die notwendigen Daten zu liefern, um mit hoher Präzision den fraktalen Chip zusammenzusetzen. Das Prinzip dieses Aufbaues und der umfassende Zugriff durch Beleuchtung und Detektion sollte die Fehlerrate extrem niedrig halten.

Zusätzlich fällt in einer solchen Kombination die aufwendige Optik für die Beleuchtung von fraktaler Phase und CCD Detektor weg.

6.2.1 Überwachung der Strömungsvorgänge

Durch die LCCD-Unit können die Strömungsvorgänge der SMART-Beads in einem FS-Chip während der Analyse überwacht werden.

6.2.2 Anregungs- und Detektionseinheit

Die Auslesung der Informationen aus einem SMART-Bead ARRAY soll in einer kombinierten Anregungs- und Detektionseinheit erfolgen, wobei folgende Anordnung vorzuziehen ist: Anregungslichtquelle direkt über dem SMART-Bead ARRAY und der CCD-Chip direkt unter dem ARRAY (Sandwichbauweise). Durch diese möglichst kompakte Bauweise werden die Lichtlaufwege und damit auch die benötigte Lichtintensität, ebenso wie Überlagerungseffekte benachbarter SMART Beads, minimiert. Auf die Verwendung einer aufwendigen, platzintensiven, lichtabsorbierenden und teuren Optik soll sowohl auf der Anregungs- als auch auf der Detektionsseite verzichtet werden.

Ein weitere Variante ist eine vertikale Ausrichtung des Chips, so daß auch Gravitationskräfte für die Be- und Entladung des Chips mit den SMART Beads genutzt werden können.

CCD-Kamera Detektion

Die Detektionseinheit besteht nur aus einem CCD-Chip. Diese haben aktuell auf einer Fläche von ca. 25 × 37 mm etwa 2000 × 3000 Farbpixel, was 6 Mio. Farbpixeln oder 18 Mio. Einzelpixeln (RGB-Prinzip durch miniaturisierte Farbfilter vor den Pixeln) entspricht (Firma Cannon). Ordnet man auf einer solchen Fläche von 25 × 37 mm Mikropartikel (SMART Beads) mit einem Durchmesser von 60 µm zur Direktdetektion an, so erhält man min. 200.000 Mikropartikel (SMART Beads). Jeder Mikropartikel überdeckt dabei ca. 40 quadratische Farbpixel mit 9 bis 10 µm Kantenlänge. Damit erhält man 40 Farb- oder 120 schwarzweiß Signale pro SMART Bead mit einer digitalen Lichtintensitätsabstufung von 256 diskreten Helligkeitsstufen je schw.-weiß Pixel. Somit ist auf jeden Fall eine ausreichende Menge an Daten für eine statistische Signalverifizierung vorhanden.

Die Grenze der maximal synchron detektierbaren, unterschiedlich farbkodierten SMART Beads liegt in der Möglichkeit der spezifischen Kodierbarkeit (chemisches Limit der reproduzierbaren Farberzeugung) der SMART Beads sowie in der Möglichkeit der optischen Erfassung der Farbunterschiede mit einem CCD-Chip. Teilt man die 256 Intensitätsstufen je Farbe (RGB) in 10 Stufen ein, so erhält man $25^3 = 15.625$ mögliche Farben, welche detektiert werden können. Baut man die Anzahl der Farbklassen durch weitere Farbfilter aus, so läßt sich die Zahl der detektierbaren Farben weiter erhöhen. Mit vierfach Farbfiltern (z. B. RGB und Magental vor dem oben beschriebenen CCD-Chip ließen sich theoretisch $25 \cdot 25^3 = 390.625$ Farben erkennen. Natürlich nur noch mit ca. 30 vierfach Farbpixeln. Aufgrund der großen Fortschritte in der CCD Technologie ist mit den aufgeführten Zahlen nur der aktuelle Stand der Technik beschrieben. Erste Prototypen haben bereits auf der gleichen Fläche 81 Mio. Pixel. Damit ergibt sich auch für die beschriebene Applikation der CCD-Chip Technologie ein großes Wachstumspotential und die parallele Detektion von 106 individuellen SMART Beads ist technisch machbar.

Wie oben ausgeführt, jedoch mit einem entsprechenden optischen Gitter zwischen SMART Bead-ARRAY und CCD-Kamera Chip.

Wie oben ausgeführt, jedoch mit einer entsprechenden Optik zwischen SMART Bead-ARRAY und CCD-Kamera Chip (nur wenn nicht vermeidbar).

6.3 Anwendung in HTS und UHTS Anlagen

Für High Throuput Screening (HTS) Anlagen ließen sich beliebig viele der Read-Write-Einheiten parallel aufbauen

bzw. modular in ein Gerät integrieren. Die Bereitstellung der Oligos, sowie der Waschflüssigkeit und der vorbereiteten Probe, ist wiederum eine Frage der Ausführungsvariante. Es ist alles möglich von der Bereitstellung im Analysegerät (eher bei HTS Anwendungen naheliegend) bis zur Bereitstellung in der genau benötigten Menge direkt im Chip, wo nur noch die Probe, z. B. nach einer PCR, zugegeben wird. Selbstverständlich ist auch die Integration der Probenvorbereitung in den Chip denkbar. Bei einer Variante sollen die Fluide nur durch die Kapillarkräfte getrieben werden. Für die einzelnen Schritte muß lediglich das integrierte Ventil durch einen Stellmotor im Read-Write Gerät ersetzt werden (z. B. von außen durch einen Mikromotor oder einen Piezoantrieb, wenn die LCCD-Unit entsprechend miniaturisiert werden soll). Wenn die einzelnen Behälter im Chip nur mit einer Folie oder Membran oder einen entsprechenden Deckel verschlossen würden, könnte man bei mangelnder Kapillarkraft (durch Experimente zu verifizieren) durch Druck von oben eine Pumpfunktion realisieren (weniger elegant).

6.4 Anwendung für die Dünnschicht-Chromatographie (DSC)

Gegebenenfalls kann bei langsamen Strömungsvorgängen auf die farbliche Markierung der Wanderung für die Detektion verzichtet werden und statt dessen eine direkte "in situ" Kontrolle durch eine kompakte und billige LCCD-Unit erfolgen.

6.5 Analytbestimmung in BioChips

Die LCCD Sandwich-Unit kann für verschiedene Varianten von BioChips verwendet werden. Dort wird von dem Einsatz der CCD Detektion eine linsenlose Signaldetektion erwartet, die min. 3 getrennte Wellenlängen-Peaks (Farben; Rot, Grün, Blau) und 64 Intensitätsstufen unterscheiden kann.

Die Integration der differenziell lokalisierbaren Anregungslichtquelle in Form eines LCD Displays wird mehrere Anregungswellenlängen (min. 3 entsprechend der Farbgebung auf Monitoren) erlauben, so daß problemlos eine Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzmarker möglich ist.

6.6 Cytometrie und Untersuchung anderer ausreichend kleiner biologischer Objekte

Die LCCD-Unit überwacht allgemein eine 2D-Matrix durch lokalisierte Lichtschranken, wobei durch die Emissionsbreite und durch die hohe Empfindlichkeit und wellenlängenabhängige Detektion spektrometrische Prinzipien verwendet werden können.

Eine solche Matrix eignet sich damit hervorragend zur Untersuchung von Partikeln, die sich in einem flüssigen Medium zwischen "Detektor" und "Analyser" befindet.

Als interessante Anwendung können als "Partikel" ganze Zeilen untersucht werden. Im Gegensatz zu einer in einer 1D-Kapillare durchgeführten Cytometrie erfolgt dann eine parallele Klassifikation der Zellen entsprechend ihrer optisch erfassbaren Parameter.

Denkbar sind die Bestimmung der Grösse, optische Eigenschaften wie etwa Fluoreszenz (nach entsprechender Markierung mit spezifischen oder unspezifischen Färbungen, z. B. Antikörper resp. lipophiler Farbstoff) oder Bewegung z. B. bei Makrophagen, pathogenen oder anderen Einzellern oä). Auch die Untersuchung ausreichend kleiner Vielzeller ist möglich, z. B. eine ganze C.elegans-Population unter bestimmten experimentellen Bedingungen.

6.7 Gelelektrophorese

In einer LCCD-Unit kann die gelelektrophoretische Trennung von biologischem Untersuchungsmaterial, z. B. von DNA in Agarose-Gelen, online überwacht und ausgewertet werden, wenn Elektrophorese-Kammer und die LDDC-Unit entsprechend integriert werden. Der Benutzer könnte die Trennung z. B. auf dem Bildschirm verfolgen.

Dadurch wäre die Auswertung zum frühest möglichen Zeitpunkt der Trennung ermöglicht, was eventuell eine enorme Zeitersparnis zur Folge hat. Die gesamte Gerätschaft könnte aufgrund der sensitiven und hochauflösenden LCCD-Unit wahrscheinlich deutlich kleiner konzipiert werden als dies zur Zeit der Fall ist, da die meisten Gelelektrophoresen primär mit dem blossen Auge beurteilt werden, und erst sekundär ein kleiner Teil der Trennungen unter einem Scanner ausgewertet wird. Aus dieser Verkleinerung folgt eine verbesserte Kühlung, die wiederum eine höhere Spannung und damit raschere Trennung ermöglicht. So ist eine weitere Beschleunigung des Vorganges denkbar und insgesamt eine grosse Zeitersparnis (in Analogie zur Kapillarelektrophorese erscheint eine Beschleunigung um den Faktor 10 durchaus realistisch, bei reduziertem Material- und Analytverbrauch).

Eine denkbare Erweiterung ist die automatische Entnahme von Material aus dem online vermessenen Elektrophoreseegel, z. B. durch einen angeschlossenen Miniroboter/computergesteuerten Apparat.

Fig. 1 zeigt in einer stark vereinfachten schematischen Darstellung eine Sandwichstruktur aus LCD-Matrix 3 (zweidimensionales Flüssigkristall-Belichtungselement), transparentem Probenträger 5 mit darin befindlichem Probenmaterial 7 und CCD-Matrix 9 (Bildaufnehmer). LCD-Matrix 3 und CCD-Matrix 9 sind von einer gemeinsamen (nicht gezeigten) Steuereinrichtung aus ansteuerbar, beispielsweise um einander zugeordnete Matricelemente der LCD-Matrix und der CCD-Matrix gleichzeitig aktiv zu schalten.

Die gezeigte Anordnung eignet sich z. B. zur Messung der optischen Absorption des Probenmaterials 7 in dem transparenten Träger 5.

Nicht zu erkennen in Fig. 1 sind Mittel zur Positionierung der LCD-Matrix relativ zur CCD-Matrix. Hierbei könnte es sich beispielsweise um Mittel zum Verschwenken der LCD-Matrix 3 relativ zur CCD-Matrix 9 handeln. Selbstverständlich können zahlreiche andere Möglichkeiten gewählt werden, um die LCD-Matrix 3 und die CCD-Matrix 9 lagerichtig zueinander zu positionieren und ggf. aneinander zu fixieren.

Patentansprüche

1. Lichtemissions-Detektionseinrichtung mit einer elektronisch steuerbaren Lichtquellenmatrix (3), vorzugsweise LCD-Matrix, und einer der Lichtquellenmatrix (3) zugewandt-gegenüberliegenden Lichtsensormatrix (9), vorzugsweise CCD-Bildaufnehmer, zur Detektion des optischen Verhaltens einer jeweiligen zwischen Lichtquellenmatrix (3) und Lichtsensormatrix (9) befindlichen Substanz (7).

2. LCD-Matrix (3) als zweidimensionale Lichtquelle zur gesteuert wahlweisen Erzeugung von zweidimensionalen Belichtungsmustern in Herstellungs- oder/und Untersuchungsverfahren mit wenigstens einem zweidimensionalen Belichtungsschritt.

3. Verwendung der Lichtemissions-Detektionseinrichtung nach Anspruch 1 in einem Verfahren zur Herstellung eines Reaktionsträgers für die Bestimmung von

Analyten in einer Probe.

4. Verwendung der Lichtemissions-Detektionseinrichtung nach Anspruch 1 in einem Verfahren zur Bestimmung von Analyten in einer Probe.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

BEST AVAILABLE COPY

Ausführungsbeispiel ①:

Fig. 1

